6月 June
2020, 63(6): 667 – 678
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2020.06.002

二点委夜蛾非典型嗅觉受体 AlepOrco 的基因克隆、原核表达及多克隆抗体制备

田彩红[1], 刘晓光[2], 黄建荣[1], 王 瑛[1], 封洪强[1,*]

(1. 河南省农业科学院植物保护研究所, 河南省农作物病虫害防治重点实验室, 农业部华北南部作物有害生物综合治理重点实验室, 河南省作物保护国际联合实验室, 河南省生物农药工程研究中心, 郑州 450002; 2. 河南农业大学植物保护学院, 省部共建小麦玉米作物学重点实验室, 郑州 450002)

摘要:【目的】非典型嗅觉受体(olfactory receptor co-receptor, Orco)与典型嗅觉受体共同形成离子通道,在昆虫嗅觉识别中具有至关重要的作用。本研究旨在克隆和表达二点委夜蛾 *Athetis lepigone* Orco 基因,明确其分子特性,为进一步研究该基因在二点委夜蛾中的功能奠定基础。【方法】将二点委夜蛾雌雄成虫触角转录组数据建立本地数据库,通过生物信息学分析获得二点委夜蛾 *Orco* 同源基因 *AlepOrco*;利用 RT-PCR 方法克隆二点委夜蛾 *AlepOrco* 基因全长,并在 pGEX-6P-1/BL21(DE3)系统中进行了该基因开放阅读框(ORF)的原核表达, 制备多克隆抗体,用 Western blot 检测抗体特异性;利用 qPCR 技术检测该基因在二点委夜蛾雌雄成虫不同组织(喙、触角、去除触角和喙的头、胸、腹、足和翅)中的表达谱。【结果】获得了二点委夜蛾 *AlepOrco* 的 cDNA(GenBank 登录号: MN583125)全长序列,开放阅读框长 1 422 bp,编码 473 个氨基酸,序列中有 7 个跨膜结构区,预测等电点为 8.59,分子量为 53.40 kD。SDS-PAGE 和 Western blot 分析结果表明 *AlepOrco* 能够在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中高效表达。利用制备的多克隆抗体对二点委夜蛾 AlepOrco 进行 Western blot 检测,其能够特异识别成虫触角中 AlepOrco 蛋白。qPCR 结果表明,*AlepOrco* 在二点委夜蛾雌雄成虫不同组织间具有相似的表达模式,都是在触角中的相对表达量最大,在翅中的表达量最小。【结论】克隆并原核表达了二点委夜蛾非典型嗅觉受体基因 *AlepOrco*,制备的多克隆抗体能够特异识别二点委夜蛾成虫触角中的 AlepOrco。结果为深入了解二点委夜蛾 *AlepOrco* 基因的结构和功能奠定了基础。

关键词: 二点委夜蛾; 非典型嗅觉受体; 基因克隆; 原核表达; 多克隆抗体; 组织表达

中图分类号: Q966　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2020)06-0667-12

cDNA cloning, prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of the olfactory receptor co-receptor AlepOrco from *Athetis lepigone* (Lepidoptera: Noctuidae)

TIAN Cai-Hong[1], LIU Xiao-Guang[2], HUANG Jian-Rong[1], WANG Ying[1], FENG Hong-Qiang[1,*]

(1. Henan Key Laboratory of Crop Pest Control, Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Southern Region of Northern China, Ministry of Agriculture, International Joint Research Laboratory for Crop Protection of Henan, Biological Pesticides Engineering Research Center of Henan Province, Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; 2. State Key Laboratory of Wheat and Maize Crop Science, College of Plant Protection, Henan

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0200602, 2018YFD0200606); 河南省科技攻关项目(17210211009); 河南省农业科学院优秀青年基金(2013YQ19)

作者简介: 田彩红, 女, 1976 年生, 河南禹州人, 博士, 副研究员, 研究方向为昆虫分子生态学, E-mail: caihongtian@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: feng_hq@163.com

收稿日期 Received: 2019-11-23; 接受日期 Accepted: 2020-01-14

Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract:【Aim】The olfactory receptor co-receptor (Orco) and the typical olfactory receptor constitute the ion channel together, playing critical roles in the olfactory activity in insects. This study aims to clone, express and characterize the Orco gene from *Athetis lepigone* so as to provide a basis for further study on the function of this gene in *A. lepigone*.【Methods】One local transcriptome database was established based on the antenna transcriptome data of female and male adults of *A. lepigone*, and a homologous gene of *Orco* in *A. lepigone*, *AlepOrco*, was obtained from bioinformatic analysis of the local transcriptome database. The full-length cDNA sequence of *AlepOrco* was cloned from *A. lepigone* using RT-PCR. The open reading frame of *AlepOrco* was further subcloned into prokaryotic expression vector pGEX-6P-1/BL21(DE3) system. Anti-AlepOrco polyclonal antibody was prepared, and its specificity was examined by Western blot. The expression patterns of *AlepOrco* in different tissues (proboscis, antennae, head without antennae and proboscis, thorax, abdomen, legs and wings) of female and male adults of *A. lepigone* were also analyzed by qPCR.【Results】The full-length cDNA of *AlepOrco* (GenBank accession no.: MN583125) of *A. lepigone* is 1 422 bp in length, encoding 473 amino acids, with seven transmembrane regions, the predicted isoelectric point of 8.59 and the molecular weight of 53.40 kD. The SDS-PAGE and Western blot results showed that *AlepOrco* was successfully expressed in *Escherichia coli*. The Western blot results indicated that the prepared antibody could specifically recognize AlepOrco from the antenna of *A. lepigone* adults. The qPCR results revealed that *AlepOrco* exhibited a similar expression pattern in different tissues of female and male adults, with the highest expression level in the antenna and the lowest expression level in the wing.【Conclusion】*AlepOrco* was cloned and successfully expressed in *E. coli*. The prepared polyclonal antibody can specifically identify the AlepOrco in the antenna of *A. lepigone* adults. The results provide a basis for further study on the structure and function of *AlepOrco* in *A. lepigone*.

Key words: *Athetis lepigone*; olfactory receptor co-receptor; gene cloning; prokaryotic expression; polyclonal antibody; tissue expression

二点委夜蛾 *Athetis lepigone* 属鳞翅目(Lepidoptera)夜蛾科(Noctuidae)委夜蛾属 *Athetis* (Bomare, 2002),是一种在世界范围内分布的以30多种寄主植物为食的多食性害虫(Lindeborg, 2007)。该害虫的幼虫2005年首次在河北被发现危害夏玉米苗,2011年在黄淮海地区暴发成灾(王振营等, 2012; Li *et al*., 2013)。随着我国农作物免耕播种、秸秆还田、种肥同播的普遍采用,加之简单的小麦-玉米连作制度的影响,其发生范围逐渐扩大,于2017年在河北唐山地区再次暴发(张尚卿等, 2018)。目前,二点委夜蛾已经成为我国黄淮海地区夏玉米上的常发性苗期害虫,是黄淮海夏玉米区的重点防控对象(王振营和王晓鸣, 2019)。其成虫善迁飞(Fu *et al*., 2014; 黄建荣等, 2018),幼虫喜阴暗潮湿环境,畏强光,常躲在玉米幼苗周围的碎麦秸下危害,常啃食苗期玉米根部,造成玉米植株损伤,缺苗断垅。在夏玉米产区暴发,常常呈现发生面积大、虫口密度高和危害程度重的特点,并造成大片死苗,严重威胁夏玉米安全生产(江幸福等, 2011; 石洁等, 2011)。由于该虫的隐蔽危害习性,单次化学防治效果甚微,常造成多次施药,不仅增加了该虫抗性产生的风险,且污染了生态环境。因此,准确监测和诱杀二点委夜蛾成为目前亟待解决的难题,迫切需要有一种高效、持久、稳定、环境友好、不伤害天敌和保护生态平衡的玉米害虫综合防治技术体系,也是“农药化肥双减”和“农药零增长”的迫切要求(吴孔明, 2018; 张凯等, 2019)。

昆虫在长期进化中,通过自身嗅觉机体反应,可以感知环境中的挥发性物质,并依此信息觅食、求偶和寻找适宜的产卵场所。触角感器中的嗅觉受体与脂溶性气味物质特异性识别与反应,是昆虫识别外界气味物质的重要一环,使昆虫可以特异地识别环境中无数不同的化学物质(Bargmann *et al*., 2006; Pelosi *et al*., 2018),也为开发新型害虫防控技术提供了重要理论基础。昆虫的非典型嗅觉受体(olfactory receptor co-receptor, Orco)能与传统嗅觉

受体形成复合体，共同形成异源二聚体配体门控阳离子通道，促进传统嗅觉受体在神经元树突上的定位并维持其稳定性，提高传统嗅觉受体对气味反应的效率（Sato *et al*., 2008；Wicher *et al*., 2008；Kaupp, 2010；Chang *et al*., 2017；Butterwick *et al*., 2018）。昆虫的非典型嗅觉受体的氨基酸序列在不同昆虫间高度保守，其编码基因已在 8 个目的 40 多种昆虫中得以鉴定（Stengl and Funk, 2013），诸如：鳞翅目的家蚕 *Bombyx mori*、烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*、双委夜蛾 *Athetis dissimilis* 等（Nakagawa *et al*., 2005；宋月芹等, 2015；Liu *et al*., 2017），同翅目的麦长管蚜 *Sitobion avenae*（Fan *et al*., 2015），半翅目的绿盲蝽 *Apolygus lucorum*（Zhou *et al*., 2014）和鞘翅目的广聚萤叶甲 *Ophraella communa*（Ma *et al*., 2019）。*Orco* 的组织特异性表达也在直翅目的东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 和沙漠蝗 *Schistocerca gregaria*（Yang *et al*., 2012），鳞翅目的斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*（Wu *et al*., 2013）和桃蛀螟 *Conogethes punctiferalis*（葛星等, 2013），以及膜翅目的棉铃虫齿唇姬蜂 *Campoletis chlorideae*（董钧锋等, 2015）中得到了详细的阐明。

二点委夜蛾作为我国耕作制度变革和气候变化引发的新害虫，其化学通讯行为值得深入研究。Zhang 等（2017, 2019）利用转录组测序数据分析鉴定了二点委夜蛾的 28 个触角气味蛋白和 20 个化学感受蛋白的生物信息学功能，并利用双电极电压钳技术研究了二点委夜蛾的 4 个信息素受体基因的功能。但对二点委夜蛾的非典型嗅觉受体基因 *AlepOrco* 的研究尚未见报道，因此，研究昆虫间高度保守的二点委夜蛾 *Orco* 基因，解析其在气味分子识别过程中的机制，探索通过调节昆虫的行为来防治二点委夜蛾的新技术，具有一定的理论价值。本研究在二点委夜蛾雌雄触角转录组数据基础上，结合 RT-PCR 技术，克隆并鉴定了二点委夜蛾非典型嗅觉受体基因，并在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中进行了原核表达，制备并检测了该基因的多克隆抗体，同时利用 qPCR 技术检测了该基因在雌雄成虫不同组织中的表达，以期为解析该基因的结构和功能奠定基础。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

二点委夜蛾为本实验室在温度为 26 ± 1℃，相对湿度为 85%，光周期为 15L∶9D 的条件下用人工饲料饲养的实验种群（田彩红等, 2013）。雌雄蛹分开放置在不同养虫笼中等待羽化，成虫羽化后饲喂以 10% 的蜂蜜水补充营养，备用。

1.2　样品的收集及总 RNA 的提取

取羽化 3 d 的未交配的二点委夜蛾雌雄成虫各 100 头，取其触角、头部（去除触角和喙）、喙、胸、腹、足和翅。每 50 ~ 100 mg 上述组织放入含有 1 mL Trizol（Invitrogen 公司）的离心管中，加适量液氮迅速充分研磨，提取得到总 RNA。总 RNA 经 DNase Ⅰ酶（TaKaRa 公司）消化后，用 NanoDrop™ 检测并记录其浓度，保证 OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.8 ~ 2.0 之间。以上实验重复 3 次，并使用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。

1.3　二点委夜蛾 *Orco* 基因的克隆鉴定

以本实验室前期获得的二点委夜蛾雌、雄成虫触角转录组 unigene 序列（数据未发表），建立核苷酸本地 BLAST 数据库。根据姚雪等（2019）调取同源基因的方法，以家蚕非典型嗅觉受体基因氨基酸序列（GenBank 登录号：NP_001037060.1）为诱饵蛋白，通过 tBlastn 搜索，钓取二点委夜蛾候选蛋白，获得二点委夜蛾 *Orco* mRNA 全长。将获得的 *Orco* mRNA 序列进行分析，设计二点委夜蛾 *Orco*（*AlepOrco*）特异性引物 AlepOrco-F 和 AlepOrco-R（表 1，酶切位点

表 1　引物信息

Table 1　Primer information

引物 Primer	引物序列(5′-3′) Primer sequence	用途 Purpose	目的片段长度(bp) Length of target fragment
AlepOrco-F	<u>GGATCC</u>ATGATGACCAAAGTGAAGACC	基因克隆及原核表达 Gene cloning and prokaryotic expression	1 422
AlepOrco-R	<u>CTCGAG</u>TTACTTGAGTTGCACCAACACCA		
AlepOrco-RT-F	GGGCAGTTCCGTAGGTATCA	qPCR	150
AlepOrco-RT-R	CTGCAGAACTTTGGCCAGCAG		
GAPDH-F	ATCTTACAAGGTCATCTCCAA		146
GAPDH-R	GTCCATCCACAGTCTTCT		

下划线序列分别为 *Bam*H Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 酶切位点。The restriction digestion sites for *Bam*H Ⅰ and *Xho* Ⅰ are respectively underlined.

以下划线标示）。将 1.2 节提取的总 RNA 2 μg 按照 SMART cDNA Library Construction Kit（Clontech 公司）合成方法合成 cDNA 第 1 链。RT-PCR 反应体系（25 μL）：cDNA 模板 2 μL，Premix Taq Version 2.0 试剂 12.5 μL，AlepOrco-F/AlepOrco-R 引物各 1 μL，去离子水 8.5 μL。反应条件：94℃ 预变性 3 min；95℃ 30 s，56℃ 1 min，72℃ 1 min，33 个循环；72℃ 总延伸 10 min。PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测并用 DNA 凝胶回收试剂盒（Axygen 公司）回收目的片段。将回收的 PCR 产物按照 3∶1 的摩尔浓度连接到 pMD18-T 载体（TaKaRa 公司）（重组质粒命名为 pMD18-T/*AlepOrco*），转化 TG1 感受态细胞，蓝白斑筛选挑出阳性克隆，将获得的阳性克隆分别大量培养，利用质粒小量制备试剂盒提取质粒 DNA（Axygen 公司），利用 *Bam*H Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ（TaKaRa）双酶切鉴定重组克隆 pMD18-T/*AlepOrco*，将对应的正确克隆在生工生物工程上海股份有限公司进行 DNA 序列测定。

1.4 生物信息学分析

将 1.3 节中测序正确的二点委夜蛾 *Orco* 核苷酸序列进行氨基酸序列预测，然后利用在线软件 Expasy（https://www.expasy.org/）进行蛋白质性质分析；氨基酸序列理化性质分析参考 Gasteiger 等（2005）分析方法。采用在线软件（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）进行信号肽预测，同时利用在线软件（http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/）进行跨膜域预测。搜集其他已知昆虫 Orco 氨基酸序列进行比对分析，比对结果用 GeneDoc 2.7 软件进行编辑（https://genedoc.software.informer.com/）。此外，根据搜集到的 *Orco* 基因的氨基酸序列，在在线软件（https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/）中，选择 Jones-Taylor-Thornton（JTT）模型，利用最大似然法（maximum likelihood method）构建系统进化树进行聚类分析。

1.5 二点委夜蛾 *Orco* 原核表达及 Western blot 检测

将 pMD18-T/*AlepOrco* 经 *Bam*H Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切后，与经同样酶切的原核表达载体 pGEX-6P-1（河南农业大学安世恒教授惠赠）连接，目的片段和酶切的质粒载体比例为 3∶1。在 T4 DNA 连接酶（TaKaRa）的作用下 16℃ 过夜连接，转化 TG1 感受态细胞，过夜培养后，提取重组质粒（命名为 pGEX/*AlepOrco*）质粒 DNA，*Bam*H Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切鉴定，鉴定正确的阳性克隆送生工生物工程上海股份有限公司测序。

将上述经鉴定正确的 pGEX/*AlepOrco* 质粒转化大肠杆菌 BL21（DE3）（河南农业大学安世恒教授惠赠）感受态细胞，挑取单菌落置于 5mL LB 培养基（含 AMP 100 μg/mL）中，200 r/min 于 37℃ 下振荡培养过夜。按 0.1%（体积比）活化转接 5 mL LB 培养基（含 AMP 100 μg/mL），200 r/min 于 37℃ 振荡培养至 OD 值达 0.6～0.8 时，加 IPTG（生工生物工程上海股份有限公司）分别至终浓度为 10，20 和 40 mmol/L，37℃ 150 r/min 诱导 8 h。6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体沉淀。用 200 μL 的 1×PBS 将沉淀重新悬浮，4 000 r/min 离心 10 min，收集沉淀，加入 200 μL 的 SDS 凝胶上样缓冲液[含 40 mmol/L Tris-HCl（pH 6.8），10% 甘油，2% SDS，5% 巯基乙醇，0.1% 溴酚蓝]后用漩涡混匀器震荡悬浮，沸水中煮沸 10 min，12 000 r/min 离心 10 min 离心后取上清，置 4℃ 保存备用（程晓东等，2011）。

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳参照徐秋芳等（2014）方法进行，Western blot 分析参照 Sambrook 等（1998）的方法进行。具体为：蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳后，取与分离胶相同大小的 PVDF 膜（Millipore），在冰浴条件下用湿式转膜仪以 120 V 电压，转膜 1.5 h，然后用含有辣根过氧化物酶标记的抗 GST 标签鼠单克隆抗体（BBI）的一抗封闭液（含 2‰ Tween-20 的 1×PBS），4℃ 冰箱中封闭过夜；第 2 天，室温反应 30 min，用洗涤缓冲液（含 0.5% Tween-20 的 pH 7.4 的 0.02 mol/L PBS）洗膜 3 次；加入封闭液稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗（Promega），室温反应 2 h，用洗涤缓冲液洗膜 3 次；最后将膜置于含有 DAB（Promega）的显色液（0.1 mol/L PBS 10 mL；临用前加 DAB 4 mg，10% H_2O_2 60 μL）中显色至条带清晰，将膜置于双蒸水中终止显色反应并拍照。

1.6 抗体的制备及特异性检测

表达产物经 SDS-PAGE 电泳后，割胶回收并纯化表达的蛋白。多克隆抗体的制备参照标准技术（程晓东等，2011）进行，免疫新西兰大白兔的工作由北京赛百盛基因技术有限公司协助完成，取其免疫前血清作为阴性对照。抗体特异性检测参照 Tian 等（2009）进行，具体操作为：取二点委夜蛾羽化后 3 d内的未交配雌雄成虫触角各 300 对，加入适量的缓冲液（1×PBS），在冰浴条件下利用电动组织研磨器研磨匀浆，加入等体积的蛋白上样缓冲液[含 100 mmol/L Tris-HCl（pH 6.8），200 mmol/L 二硫苏糖醇（DTT），4% SDS，0.2% 溴酚蓝，20% 甘油]，沸水煮

10 min，4℃条件下 12 000 r/min 离心 10 min，取上清 10 μL，进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析，Western blot 的一抗采用制备的多克隆抗体，二抗采用辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG（Promega），阴性对照采用免疫前血清。

1.7 *AlepOrco* 在二点委夜蛾成虫不同组织中的表达

将 1.3 节获得二点委夜蛾非典型嗅觉受体基因序列用 Primer3web Version 4.1.0 引物设计软件设计特异性引物（Untergasser *et al*., 2012; Kõressaar *et al*., 2018）。AlepOrco-RT-F 和 AlepOrco-RT-R（表 1）用于测定 *AlepOrco* 在二点委夜蛾成虫不同组织中的表达，以 *AlepGAPDH* 作为内参基因（Zhang *et al*., 2017），引物序列见表 1。引物由生工生物工程上海股份有限公司负责合成。具体操作方法如下：取 2 μg 1.2 节获得的各组织总 RNA，DNase Ⅰ 酶消化后，按照试剂盒 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser（TaKaRa）说明书进行反转录。之后，按照 SYBR *Premix Ex* Taq™（Tli RNaseH Plus）（TaKaRa）的使用说明配制 PCR 反应液，反应体系（20 μL）：SYBR*Premix Ex* Taq™ Ⅱ 10 μL，上下游引物（0.2 μmol/L）各 1 μL，cDNA 模板 1 μL，经 DEPC（TaKaRa）处理的灭菌超纯水 7 μL。每个样本组织设 3 个生物学重复，每个生物学重复的组织样本分别来自羽化 3 d 未交配的二点委夜蛾雌、雄成虫各 100 头，每样品 3 个技术重复。在 StepOnePlus™ Real-Time PCR System（Applied Biosystems，USA）定量 PCR 仪上进行反应。反应条件：95℃预变性 3 min；95℃变性 10 s，60℃退火 30 s，共计 40 个循环。溶解曲线分析后提取有效样品数据，阴性对照为在反应体系中加入不含 DNA 模板的 DEPC 处理过的灭活双蒸水。

1.8 数据分析

以二点委夜蛾雌蛾触角中 *Orco* 基因的表达量为基准（宋月芹等，2015），利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法（Livak and Schmittgen, 2001）计算基因相对表达量，采用 3 次生物学实验重复，误差取 3 次实验重复的标准差。数据统计分析采用 SPSS 19.0 软件；相同组织不同性别间基因表达量差异用 *t* 测验，相同性别不同组织间基因表达量差异用单因素方差分析。

2 结果

2.1 二点委夜蛾 *Orco* 基因的克隆及序列分析

获得了二点委夜蛾 *AlepOrco* 基因（GenBank 登录号：MN583125）cDNA 全长序列，长度为 1 422 bp，共编码 473 个氨基酸残基，预测等电点为 8.59，分子量为 53.40 kD。

序列分析表明该基因编码蛋白 AlepOrco 氨基酸序列中不存在信号肽序列，但存在 7 个跨膜区，分别位于第 45－65，74－97，135－158，193－216，333－356，375－396 和 446－469 位氨基酸处。疏水性分析表明，亲脂性氨基酸占据了序列的大部分，尤其是第 800－1 000 位氨基酸的亲脂性较高，在第 0－200 位氨基酸后也存在较高亲脂性区域。在编码的 473 个氨基酸中，疏水氨基酸个数和对应的占编码的氨基酸总百分数分别是：51 个亮氨酸（Leu），占 10.8%；41 个丙氨酸（Ala），占 8.7%；36 个丝氨酸（Ser），占 7.6%；36 个苏氨酸（Thr），占 7.6%；31 个苯丙氨酸（Phe），占 6.6%；31 个缬氨酸（Val），占 6.6%。蛋白不稳定指数为 30.67，脂溶指数为 93.64，总亲水性平均系数为 0.23，可推测该蛋白为脂溶性蛋白。

氨基酸序列比对分析结果表明，二点委夜蛾 Orco 与其他鳞翅目昆虫 Orco 氨基酸序列一致性在 90% 以上，其中与双委夜蛾 Orco 的氨基酸序列一致性最高，达 99.15%；与鳞翅目其他昆虫如疆夜蛾 *Peridroma saucia*、粘虫 *Mythimna separata*、草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*、烟青虫 *Helicoverpa assulta*、黄地老虎 *Agrotis segetum* 和大螟 *Sesamia inferens* 等的 Orco 的氨基酸序列一致性分别为 96.83%，96.41%，95.77%，95.56%，95.35% 和 95.14%；与其他目昆虫 Orco 氨基酸序列一致性较与鳞翅目的稍低，其中与黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 Orco 氨基酸序列一致性为 75.30%（图 1）。

系统进化树结果显示，二点委夜蛾 Orco 与同属夜蛾科的双委夜蛾的 Orco 亲缘关系最近，其次是与粘虫、疆夜蛾和黄地老虎的 Orco，而与同属鳞翅目蚕蛾科的家蚕、菜蛾科的小菜蛾 *Plutella xylostella* 和螟蛾科的二化螟 *Chilo suppressalis* 的 Orco 亲缘关系稍远，与双翅目的黑腹果蝇的 Orco 亲缘关系最远（图 2），这与 Orco 氨基酸序列同源联配分析结果（图 1）是相吻合的。

2.2 二点委夜蛾 *Orco* 原核表达与 Western blot 分析

经终浓度为 10 mmol/L 的 IPTG 诱导，蛋白表达量最大（图 3：A，泳道 3），产生 79 kD 左右的特异性蛋白条带（图 3：A，泳道 3，4，5），而未插入目的片段的 pGEX-6P-1 空载体经诱导产生 26 kD 大小的蛋白条带（图 3：A，泳道 2）。以鼠抗 GST 标签单克隆

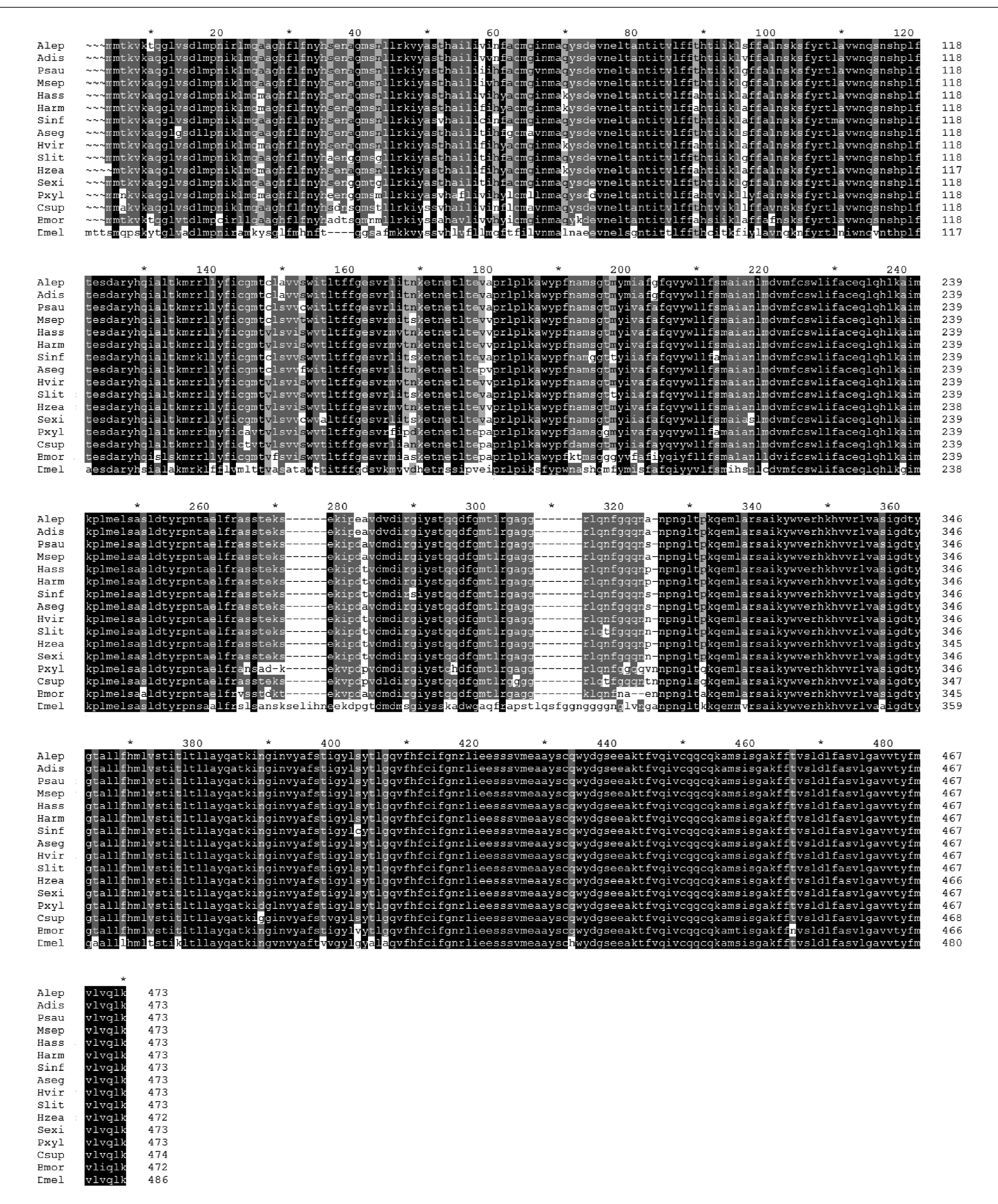


图 1　二点委夜蛾与其他昆虫 Orco 的氨基酸序列比对

Fig. 1　Amino acid sequence alignment of Orco proteins from *Athetis lepigone* and other insects

不同昆虫种的 Orco 及其 GenBank 登录号 Orco proteins from different insect species and their respective GenBank accession numbers：Alep：二点委夜蛾 *Athetis lepigone*（AOE41007.1）；Adis：双委夜蛾 *Athetis dissimilis*（KR632987）；Psau：疆夜蛾 *Peridroma saucia*（AQY16413.1）；Msep：粘虫 *Mythimna separata*（BAG71415.1）；Hass：烟青虫 *Helicoverpa assulta*（ABU45983.2）；Harm：棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（XP_021195606.1）；Sinf：大螟 *Sesamia inferens*（AGY14565.1）；Aseg：黄地老虎 *Agrotis segetum*（AGS41440.1）；Hvir：苜蓿夜蛾 *Heliothis viriplaca*（AFI25169.1）；Slit：斜纹夜蛾 *Spodoptera littoralis*（ABQ82137.1）；Hzea：谷实夜蛾 *Helicoverpa zea*（AAX14773.1）；Sexi：甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*（AAW52583.1）；Pxyl：小菜蛾 *Plutella xylostella*（XP_011558816.1）；Csup：二化螟 *Chilo suppressalis*（AFQ94041.1）；Bmor：家蚕 *Bombyx mori*（NP_001037060.1）；Dmel：黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*（NP_524235.2）. 图 2 同 The same for Fig. 2. 黑色阴影表示氨基酸序列 100% 一致性，灰色阴影表示序列 80% 一致性。The amino acid sequences with 100% identity are in black shade, while those with 80% identity are in grey shade.

抗体为一抗对表达产物进行 Western blot 分析，pGEX/*AlepOrco* 经 IPTG 诱导产生约 79 kD 的蛋白条带与 GST 抗体发生了很强的交叉反应（图 3：B，条带以箭头标记），表明融合蛋白得到了有效表达。

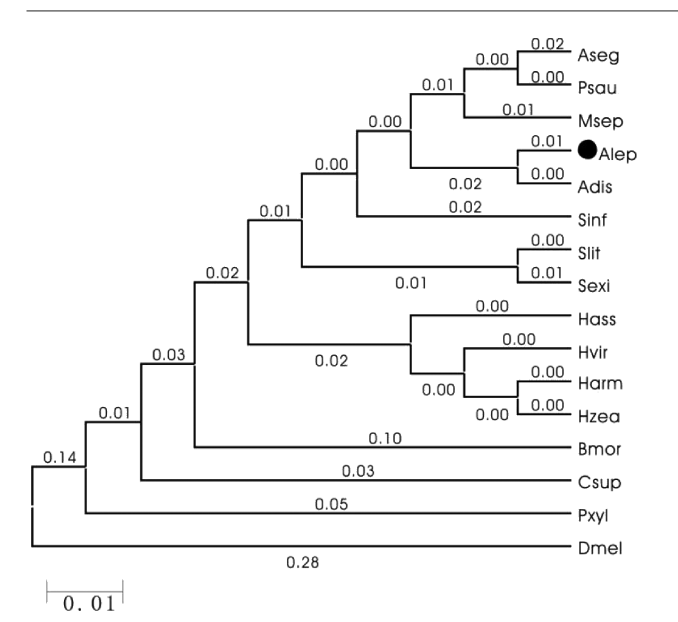


图 2 最大似然法构建的基于氨基酸序列的昆虫 Orco 系统进化树(MEGA ver. 7.0.14, 1 000 次重复)

Fig. 2 Phylogenic tree of Orco proteins from different insect species based on amino acid sequences by maximum likelihood method (MEGA ver. 7.0.14, 1 000 replicates)

遗传距离以比例标尺表示。Genetic distance is indicated by scale bar.

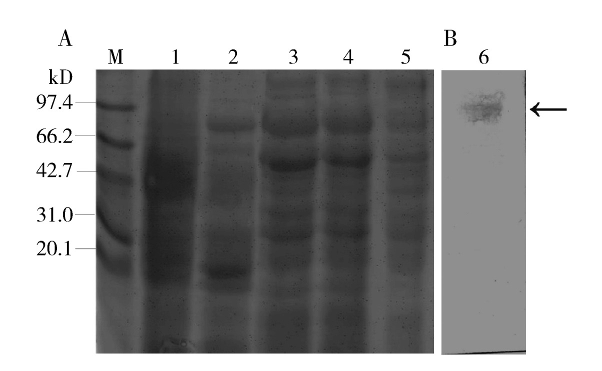


图 3 pGEX/*AlepOrco* 的原核表达蛋白的 SDS-PAGE (A) 和 Western blot (B)分析

Fig. 3 SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analysis of the expressed protein of pGEX/*AlepOrco* in prokaryotic expression system

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；1：BL21 阴性对照 BL21 negative control；2：pGEX-6P-1 转化 BL21 的表达产物 Expression product of pGEX-6P-1 in BL21；3：IPTG 终浓度为 10 mmol/L 时，pGEX/*AlepOrco* 的表达产物 Expression product of pGEX/*AlepOrco* induced by IPTG (10 mmol/L)；4：IPTG 终浓度为 20 mmol/L 时，pGEX/*AlepOrco* 的表达产物 Expression product of pGEX/*AlepOrco* induced by IPTG (20 mmol/L)；5：IPTG 终浓度为 40 mmol/L 时，pGEX/*AlepOrco* 的表达产物 Expression product of pGEX/*AlepOrco* induced by IPTG (40 mmol/L)；6：IPTG 终浓度为 10 mmol/L 时，pGEX/*AlepOrco* 的表达产物(箭头标示) Expression product (marked by an arrow) of pGEX/*AlepOrco* induced by IPTG (10 mmol/L).

2.3 二点委夜蛾 Orco 多克隆抗体检测

Western blot 检测结果显示，在二点委夜蛾的雌雄成虫触角蛋白中出现了 53 kD 左右的印迹(图 4：条带 2 和 4)，而在以免疫前兔血清作为一抗的对照中，在二点委夜蛾雌雄成虫触角中并没有检测到特异性条带(图 4：条带 1 和 3)。表明所制备的多克隆抗体能够特异的识别二点委夜蛾成虫触角内的 Orco 蛋白。

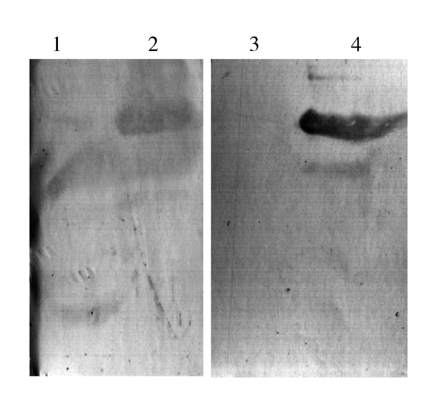


图 4 Western blot 检测抗体对二点委夜蛾雌雄成虫触角中 AlepOrco 的特异性

Fig. 4 Antibody specificity to *AlepOrco* protein in antennae of female and male adults of *Athetis lepigone* by Western blotting

1：雌成虫触角(一抗为免疫前兔血清，作为对照) Antenna of female adults (preimmune serum was used as the primary antibodies for control)；2：雌成虫触角(一抗为所制备的多克隆抗体) Antenna of female adults (anti-AlepOrco was used as the primary antibodies)；3：雄成虫触角(一抗为免疫前兔血清，作为对照) Antenna of male adults (pre-immune serum was used as the primary antibodies for control)；4：雄成虫触角(一抗为所制备的多克隆抗体) Antenna of male adults (anti-AlepOrco was used as the primary antibodies).

2.4 二点委夜蛾 *Orco* 在成虫不同组织中的表达

qPCR 检测结果表明，*AlepOrco* 在二点委夜蛾雌雄成虫($F=42.75$, $P<0.01$)和不同组织间($F=112.41$, $P<0.01$)存在显著的差异，*AlepOrco* 在雌雄成虫不同组织中具有相似的表达模式，都是在触角中的相对表达量最大，在翅中的相对表达量最小。在雄成虫不同组织间，*AlepOrco* 表达量差异显著($F=88.9$, $P<0.01$)，在雄成虫的触角中表达量最高，约是雌成虫触角中表达量的 5.7 倍；其次为在雄成虫的喙部，与其他组织相比，差异显著($P<0.05$)，足部次之，然后依次为腹部、胸部、去除触角和喙的头部，在翅中的相对表达量最低。*AlepOrco* 在雌成虫不同组织间的表达量也不同($F=169.6$, $P<0.01$)，尽管与雄成虫具有相似的表达模式，但

是,与在第 2 位的足部中的表达量相比,并没有达到显著差异($P > 0.05$),足部的相对表达量则显著大于喙部,其后依次为:在腹部中的相对表达量显著大于胸部中的,胸部中的相对表达量显著大于去除触角和喙的头部中的($P < 0.05$),去除触角和喙的头部中的相对表达量显著大于翅的($P < 0.05$)(图 5)。

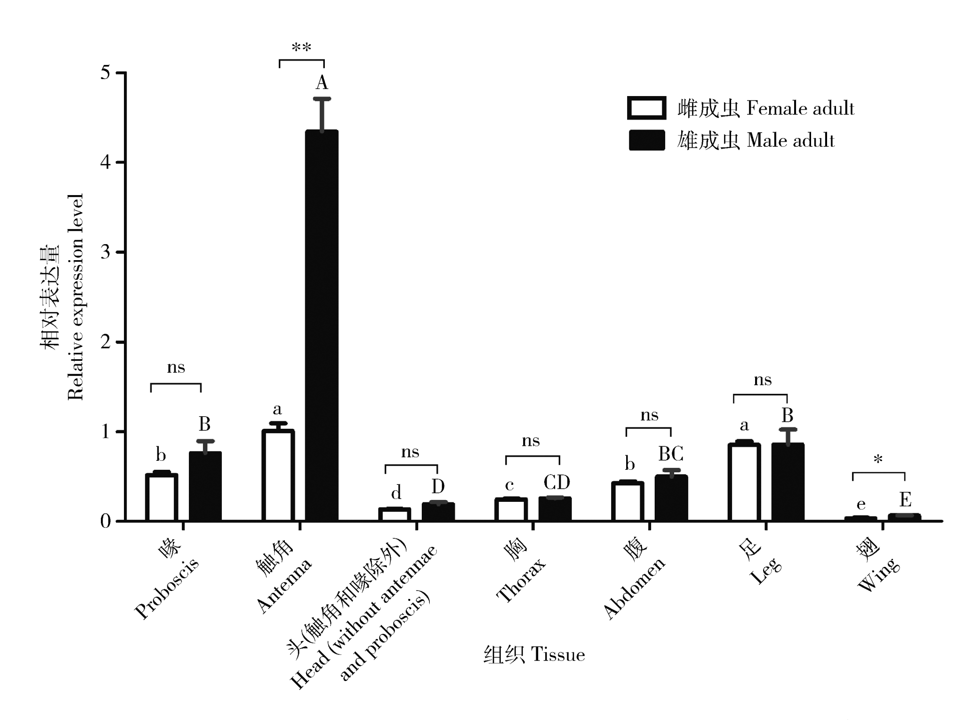


图 5 qPCR 分析 *AlepOrco* 在二点委夜蛾雌雄成虫不同组织中的表达谱

Fig. 5 Expression profiles of *AlepOrco* in different tissues of female and male adults of *Athetis lepigone* detected by qPCR

图中数据为平均值 ± 标准差;柱上不同大写字母和小写字母分别代表 *AlepOrco* 基因表达在雄成虫和雌成虫不同组织间的相对表达量的差异显著性($P < 0.01$, ANOVA 和 Duncan 氏新复极差法);柱上 ns、星号和双星号分别表示基因表达量在相同组织不同性别间差异不显著($P > 0.05$)、差异显著($P < 0.05$)和差异极显著($P < 0.01$)(t 测验)。Data in the figure are mean ± *SE*. Different capital and lowercase letters above bars indicate significant differences in the gene expression level of male and female adults between different tissues (ANOVA and Duncan's new multiple range test, $P < 0.01$), respectively. ns, asterisk and double asterisk above bars represent no significant difference ($P > 0.05$), significant difference ($P < 0.05$) and extremely significant difference ($P < 0.01$), respectively, in the gene expression level in the same tissue among different sexes (t-test).

3 讨论

本研究对二点委夜蛾的非典型嗅觉受体基因进行了克隆、原核表达和多克隆抗体制备,并明确了其在雌雄成虫不同组织内的分布,为将来利用 RNAi 或者基因编辑系统等深入研究其基因功能,明确其嗅觉分子机制,阐明其是否具有味觉功能奠定了基础。

序列比对分析表明,二点委夜蛾 Orco 与双委夜蛾 Orco 氨基酸序列的一致性高达 99%,进化树分析结果也表明了二者亲缘关系最近(图 1 和 2)。可能是因为二者同属鳞翅目夜蛾科委夜蛾属,具有相似的基因起源,研究表明,这两种昆虫具有相似地理分布及危害方式,常常在夏玉米田混合发生,都具有隐蔽危害习性(宋月芹等, 2015)。Orco 在昆虫嗅觉神经嗅觉系统中广泛表达,在不同目间高度保守(Krieger *et al*., 2003; Bargmann, 2006)。本研究发现,二点委夜蛾 *Orco* 与鳞翅目的疆夜蛾、粘虫、草地贪夜蛾、烟青虫、黄地老虎、大螟等序列高度保守,一致性高达 95% 以上,与双翅目的黑腹果蝇的 *Orco* 关系较远,一致性为 75%(图 2)。

本研究原核表达了二点委夜蛾 *Orco* 开放阅读框蛋白,并利用回收的蛋白制备了多克隆抗体。经 IPTG 在 37℃ 诱导下,经 SDS-PAGE 和 Western blot 检测结果证明,基因得到了有效表达(图 3)。通过回收蛋白制备抗体过程中,发现所表达的蛋白主要以包涵体的形式存在于菌体沉淀中。这种不溶性蛋

白质颗粒形式存在的表达产物,不具有生物学活性,今后的工作是尝试在真核表达系统(例如杆状病毒昆虫细胞表达系统)进行表达,以获得应用广泛的可溶性融合蛋白,并对 *AlepOrco* 基因的分子生物学功能进行深入研究。目前的研究,对抗体的利用主要在利用抗体组织定位方面,通过免疫组织化学方法在冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 和致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* 的触角、下颚须和喙中均检测到了 Orco 蛋白,通过进一步在 3 种蚊子的触角感受器进行定位发现蛋白主要分布在冈比亚按蚊触角鞭节除基部第 1 节部分的各节,不同的是埃及伊蚊和致倦库蚊 *Orco* 在所有鞭节上均有分布(Melo *et al*., 2004; Pitts *et al*., 2004; Xia and Zwiebel, 2006),且埃及伊蚊的 *Orco* 仅分布在第 1 鞭节的末端 1/3 处(Melo *et al*., 2004)。中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* Orco 被定位在触角鞭节的板形感器和毛形感器上,且在毛形感器上较多(张林雅等, 2012; 张中印等, 2016)。本研究制备的抗体为在已经明确了二点委夜蛾触角感器种类的基础上(田彩红等, 2015, 2016)进行下一步的组织定位及功能研究奠定了基础。

本研究通过 qPCR 表明,*AlepOrco* 在二点委夜蛾雄成虫触角中表达量最高,是在雌蛾触角中表达量的 5.7 倍(图 5),该表达模式与多数昆虫 *Orco* 如双委夜蛾(宋月芹等, 2015),华山松大小蠹 *Dendroctonus armandi*(Zhang *et al*., 2016),中华蜜蜂(张中印等, 2016)等昆虫的表达分布情况一致。*AlepOrco* 除了在触角中高表达之外,在去除触角和喙的成虫的头部、喙、胸、腹、足和翅中也有表达(图 5),不同于同为鳞翅目的斜纹夜蛾,其 *Orco* 仅在触角中特异性表达(Dong *et al*., 2012),而与无花果黄蜂 *Ceratosolen solmsi Orco*(Lu *et al*., 2009)、中华蜜蜂 *Orco*(张林雅等, 2012)、桃蛀螟 *Dichocrocis punctiferalis Orco*(葛星等, 2013)和西方角蝇 *Haematobia irritans Orco*(Olafson, 2013)的分布表达情况一致。尤其是在足部,*AlepOrco* 表达量位于这 7 个组织中表达量的第 2 位(图 5),与双委夜蛾 *Orco*(宋月芹, 2015)相反,其在雄虫中表达量略大于雌虫中的,与致倦库蚊只在雄虫足中 *Orco* 的表达(Xia and Zwiebel, 2006)又有所不同。本研究发现,在二点委夜蛾雌雄成虫喙中 *AlepOrco* 的表达量仅次于在触角和足中的表达量,且在雄成虫喙部的表达量大于在雌成虫喙部的表达量,但无显著差异(图 5),而同为鳞翅目的甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua Orco* 在雌雄蛾的触角和喙中也都有表达,但喙中表达量极低(张逸凡等, 2011)。直翅目的飞蝗 *Locusta migratoria* 和沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* 的成虫口器中也有 *Orco* 的表达(Yang *et al*., 2012),说明在味觉感受器中 *Orco* 也有表达。我们在用扫描电镜研究二点委夜蛾触角及附肢的感器类型时,在二点委夜蛾的成虫喙部也观察了丰富的感器类型(田彩红等, 2015, 2016),而 Krieger 等(2002)利用原位杂交的方法在烟芽夜蛾的喙的感受器细胞中也检测到 *Orco*, 进而推测,*Orco* 在发挥嗅觉功能的同时是否行使了味觉功能,值得将来进一步研究。

本研究通过克隆和原核表达二点委夜蛾 *Orco* 基因,并制备了蛋白的多克隆抗体,并明确了在雌雄成虫不同组织内的分布,为将来利用 RNAi 或者基因编辑系统等深入研究其基因功能,明确其嗅觉分子机制,阐明其是否具有味觉功能奠定了基础。

致谢　特别感谢美国密苏里大学崔英俊博士对本文做出的修改。

参考文献(References)

Bargmann CI, 2006. Comparative chemosensation from receptors to ecology. *Nature*, 444(7117): 295 – 301.

Bomare NF, 2002. Biology taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: Gaugler R ed. Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing, Oxon, UK. 35 – 56.

Butterwick JA, Del M, Del J, Kim KH, Kahlson MA, Rogow JA, Walz T, Ruta V, 2018. Cryo-EM structure of the insect olfactory receptor Orco. *Nature*, 560(7719): 447 – 452.

Chang H, Liu Y, Dong A, Jiang X, Dong S, Wang G, 2017. A pheromone antagonist regulates optimal mating time in the moth, *Helicoverpa armigera*. *Curr. Biol*., 27(11): 1610 – 1615.

Cheng XD, An SH, Wang HT, Wang TT, Luo MH, Guo XR, Yuan GH, 2011. cDNA cloning, prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of *GOBP2* from *Ostrinia furnacalis* (Guenée). *Sci. Agric. Sin*., 44(10): 2029 – 2038. [程晓东, 安世恒, 王海亭, 王甜甜, 罗梅浩, 郭线茹, 原国辉, 2011. 亚洲玉米螟 *GOBP2* 的克隆、原核表达及多克隆抗体制备. 中国农业科学, 44(10): 2029 – 2038]

Dong JF, Song YQ, Sun JG, Yan ZN, Sun YL, Wang CZ, 2015. Cloning and tissue expression profiling of the olfactory receptor gene *CchlOrco* in *Campoletis chlorideae* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Acta Entomol. Sin*., 58(6): 603 – 609. [董钧锋, 宋月芹, 孙九光, 闫志宁, 孙亚兰, 王琛柱, 2015. 棉铃虫齿唇姬蜂嗅觉受体

基因 *CchlOrco* 的克隆及组织表达谱分析. 昆虫学报, 58(6): 603 – 609]

Dong X, Zhong G, Hu M, Yi X, Zhao H, Wang H, 2012. Molecular cloning and functional identification of an insect odorant receptor gene in *Spodoptera litura* (F.) for the botanical insecticide rhodojaponin III. *J. Insect Physiol*., 59(1): 26 – 32.

Fan J, Zhang Y, Francis F, Cheng D, Sun J, Chen J, 2015. Orco mediates olfactory behaviors and winged morph differentiation induced by alarm pheromone in the grain aphid, *Sitobion avenae*. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 64: 16 – 24.

Fu X, Liu Y, Li Y, Ali A, Wu K, 2014. Does *Athetis lepigone* moth (Lepidoptera: Noctuidae) take a long-distance migration? *J. Econ. Entomol*., 107(3): 995 – 1002.

Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A, 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. In: Walker JM, Totowa NJ eds. The Proteomics Protocols Handbook. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 571 – 607.

Ge X, Zhang TT, He KL, Wang QY, Li YL, Wang ZY, 2013. Cloning and tissue expression profiling of the olfactory receptor coreceptor gene in adults of *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Acta Entomol. Sin*., 56(3): 243 – 250. [葛星, 张天涛, 何康来, 王勤英, 李云龙, 王振营, 2013. 桃蛀螟成虫 Orco 嗅觉受体基因的克隆及组织表达谱分析. 昆虫学报, 56(3): 243 – 250]

Huang JR, Huang B, Zhu J, Feng HQ, 2018. Using vertical looking radar (VLR) to observe the migratory behavior of the second generation *Athetis lepigone* moths in the southern part of north China in 2016. *Chin. J. Appl. Entomol*., 55(2): 168 – 176. [黄建荣, 黄博, 朱健, 封洪强, 2018. 2016 年华北南部二代二点委夜蛾成虫迁飞的雷达观测. 应用昆虫学报, 55(2): 168 – 176]

Jiang XF, Luo LZ, Jiang YY, Zhang YJ, Zhang L, Wang ZY, 2011. Damage characteristics and outbreak causes of *Athetis lepigone* in China. *Plant Prot*., 37(6): 130 – 33. [江幸福, 罗礼智, 姜玉英, 张跃进, 张蕾, 王振营, 2011. 二点委夜蛾发生为害特点及暴发原因初探. 植物保护, 37(6): 130 – 133]

Kaupp UB, 2010. Olfactory signaling in vertebrates and insects: differences and commonalities. *Nat. Rev. Neurosci*., 11(3): 188 – 200.

Kõressaar T, Lepamets M, Kaplinski L, Raime K, Andreson R, Remm M, 2018. Primer3_masker: integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics*, 34(11): 1937 – 1938.

Krieger J, Klink O, Mohl C, Raming K, Breer H, 2003. A candidate olfactory receptor subtype highly conserved across different insect orders. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol*., 189(7): 519 – 526.

Krieger J, Raming K, Dewer YME, Bette S, Conzelmann S, Breer H, 2002. A divergent gene family encoding candidate olfactory receptors of the moth *Heliothis virescens*. *Eur. J. Neurosci*., 16: 619 – 628.

Li LT, Zhu YB, Ma JF, Li ZY, Dong ZP, 2013. An analysis of the *Athetis lepigone* transcriptome from four developmental stages. *PLoS ONE*, 8(9): e73911.

Lindeborg M, 2007. Remarkable records of Macrolepidoptera in Sweden, 2005. *Entomol. Tidskr*., 128(1 – 2): 19 – 32.

Liu Q, Liu W, Zeng B, Wang G, Hao D, Huang Y, 2017. Deletion of the *Bombyx mori* odorant receptor co-receptor (*BmOrco*) impairs olfactory sensitivity in silkworms. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 86: 58 – 67.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). *Methods*, 25(4): 402 – 408.

Lu B, Wang N, Xiao J, Xu Y, Murphy RW, Huang D, 2009. Expression and evolutionary divergence of the non-conventional olfactory receptor in four species of fig wasp associated with one species of fig. *BMC Evol. Biol*., 9: 43.

Ma C, Zhao C, Cui S, Zhang Y, Chen G, Chen H, Wan F, Zhou Z, 2019. Identification of candidate chemosensory genes of *Ophraella communa* LeSage (Coleoptera: Chrysomelidae) based on antennal transcriptome analysis. *Sci. Rep*., 9: 15551.

Melo AC, Rützler M, Pitts RJ, Zwiebel LJ, 2004. Identification of a chemosensory receptor from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, that is highly conserved and expressed in olfactory and gustatory organs. *Chem. Senses*, 29(5): 403 – 410.

Nakagawa T, Sakurai T, Nishioka T, Touhara K, 2005. Insect sex pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors. *Science*, 307(5715): 1638 – 1642.

Olafson PU, 2013. Molecular characterization and immunolocalization of the olfactory co-receptor Orco from two blood-feeding muscid flies, the stable fly (*Stomoxys calcitrans*, L.) and the horn fly (*Haematobia irritans irritans*, L.). *Insect Mol. Biol*., 22(2): 131 – 142.

Pelosi P, Iovinella I, Zhu J, Wang G, Francesca RD, 2018. Beyond chemoreception: diverse tasks of soluble olfactory proteins in insects. *Biol. Rev*., 93(1): 184 – 200.

Pitts RJ, Fox AN, Zwiebel LJ, 2004. A highly conserved candidate chemoreceptor expressed in both olfactory and gustatory tissues in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(14): 5058 – 5063.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1998. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY. 362 – 371.

Sato K, Pellegrino M, Nakagawa T, Nakagawa T, Vosshall LB, Touhara K, 2008. Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature*, 452(7190): 1002 – 1006.

Shi J, Wang ZY, Jiang YY, Shan XN, Zhang HJ, Wang J, Ge X, 2011. Preliminary report on investigation of the overwintering sites of *Athetis lepigone*. *Plant Prot*., 37(6): 138 – 140. [石洁, 王振营, 姜玉英, 单旭南, 张海剑, 王静, 戈星, 2011. 二点委夜蛾越冬场所调查初报. 植物保护, 37(6): 138 – 140]

Song YQ, Li WL, Liu ST, Sun HZ, Shi J, Dong JF, 2015. Cloning, molecular characteristics and expression pattern of the olfactory receptor co-receptor gene of *Athetis dissimilis*. *J. Plant Prot*., 42(6): 997 – 1003. [宋月芹, 李文亮, 刘顺通, 孙会忠, 石洁, 董钧锋, 2015. 双委夜蛾非典型嗅觉受体 Orco 的克隆、分子特

征及表达. 植物保护学报, 42(6): 997-1003]

Stengl M, Funk NW, 2013. The role of the coreceptor Orco in insect olfactory transduction. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.*, 199(11): 897-909.

Tian CH, Feng HQ, Xu P, Li GP, Qiu F, Feng HY, 2013. Larval artificial feed of *Athetis lepigone*. National Invention Patent, China, ZL201210313981.6. [田彩红, 封洪强, 许鹏, 李国平, 邱峰, 封洪云, 2013. 二点委夜蛾幼虫人工饲料. 国家发明专利, 中国, ZL201210313981.6]

Tian CH, Feng HQ, Wang Y, Hu YM, Gao LN, Qiu F, Li GP, Huang JR, 2016. A method for sample preparation of antennae and appendages of insects by scanning electron microscopy. National Invention Patent, China, ZL201410051505.0. [田彩红, 封洪强, 王瑛, 胡永敏, 高丽娜, 邱峰, 李国平, 黄建荣, 2016. 一种昆虫触角及附肢的扫描电镜样品处理方法. 国家发明专利, 中国, ZL201410051505.0]

Tian CH, Wang Y, Feng HQ, Liu ST, Qiu F, Li GP, 2015. The ultrastructures of the antennal sensilla of *Athetis lepigone*. *Plant Prot.*, 41(1): 63-67. [田彩红, 王瑛, 封洪强, 刘顺通, 邱峰, 李国平, 2015. 二点委夜蛾触角感器的超微结构研究. 植物保护, 41(1): 63-67]

Tian CH, Zhao JF, Xu YP, Xue J, Zhang BQ, Cui YJ, Zhang MJ, Bao YY, Zhang CX, 2009. Involvement of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus ORF41 (*Bm*41) in BV production and ODV envelopment. *Virology*, 387(1): 184-192.

Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG, 2012. Primer3 - New capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.*, 40(15): e115.

Wang ZY, Shi J, Dong JG, 2012. Reason analysis on *Proxenus lepigone* outbreak of summer corn region in the Yellow River, Huai and Hai Rivers Plain and the countermeasures suggested. *J. Maize Sci.*, 20(1): 132-134. [王振营, 石洁, 董金皋, 2012. 2011 年黄淮海夏玉米区二点委夜蛾暴发危害的原因与防治对策. 玉米科学, 20(1): 132-134]

Wang ZY, Wang XM, 2019. Current status and management strategies for corn pests and diseases in China. *Plant Prot.*, 45(1): 1-11. [王振营, 王晓鸣, 2019. 我国玉米病虫害发生现状、趋势与防控对策. 植物保护, 45(1): 1-11]

Wicher D, Schfer R, Bauernfeind R, Stensmyr MC, Heller R, Heinemann SH, Hansson BS, 2008. *Drosophila* odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide-activated cation channels. *Nature*, 452(7190): 1007-1011.

Wu KM, 2018. Development direction of crop pest control science and technology in China. *J. Agric.*, 8(1): 35-38. [吴孔明, 2018. 中国农作物病虫害防控科技的发展方向. 农学学报, 8(1): 35-38]

Wu ZN, Chen X, Du YJ, Zhou JJ, ZhuGe QC, 2013. Molecular identification and characterization of the Orco orthologue of *Spodoptera litura*. *Insect Sci.*, 20(2): 175-182.

Xia Y, Zwiebel LJ, 2006. Identification and characterization of an odorant receptor from the West Nile virus mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36(3): 169-176.

Xu QF, Chen QQ, Ni HP, Li S, Zhang JF, Zhou YJ, 2014. Cloning, prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of tropomyosin gene in *Laodelphax striatellus* Fallen. *Sci. Agric. Sin.*, 47(19): 3791-3798. [徐秋芳, 陈晴晴, 倪海平, 李硕, 张金凤, 周益军, 2014. 灰飞虱原肌球蛋白的基因克隆、原核表达及多克隆抗体制备. 中国农业科学, 47(19): 3791-3798]

Yang Y, Krieger J, Zhang L, Breer H, 2012. The olfactory co-receptor Orco from the migratory locust (*Locusta migratoria*) and the desert locust (*Schistocerca gregaria*): identification and expression pattern. *Int. J. Biol. Sci.*, 8(2): 159-170.

Yao X, Li LH, Wei JZ, Xi YQ, Du MF, Cui JK, An SH, Liu XG, 2019. Molecular characterization and functional analysis of tyrosine hydroxylase gene in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomol. Sin.*, 62(3): 294-303. [姚雪, 李琳红, 魏纪珍, 席玉强, 杜孟芳, 崔江宽, 安世恒, 刘晓光, 2019. 棉铃虫酪氨酸羟化酶基因的分子特性及功能分析. 昆虫学报, 62(3): 294-303]

Zhang K, Feng TZ, Xiong C, Zhang Z, 2019. Top design and progress in research and development of synthesis technique for reduction and synergy of chemical fertilizers and pesticides in China. *J. Plant Prot.*, 46(5): 943-953. [张凯, 冯推紫, 熊超, 张昭, 2019. 我国化学肥料和农药减施增效综合技术研发顶层布局与实施进展. 植物保护学报, 46(5): 943-953]

Zhang LY, Xie BH, Ni CX, Zhao L, Li HL, Shang HW, 2012. Cloning, expression and subcellular localization of the olfactory coreceptor Orco gene in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Entomol. Sin.*, 55(11): 1246-1254. [张林雅, 谢冰花, 倪翠侠, 赵磊, 李红亮, 商晗武, 2012. 中华蜜蜂 Orco 嗅觉受体基因的克隆、表达及亚细胞定位. 昆虫学报, 55(11): 1246-1254]

Zhang RG, Gao G, Chen H, 2016. Silencing of the olfactory co-receptor gene in *Dendroctonus armandi* leads to EAG response declining to major host volatiles. *Sci. Rep.*, 6: 23136.

Zhang SQ, Han XQ, Wu ZH, She HD, Zhang DM, Shi J, Li YF, 2018. Report on the harm of *Athetis lepigone* to summer maize in eastern of Hebei. *J. Maize Sci.*, 26(2): 138-141. [张尚卿, 韩晓清, 吴志会, 佘花娣, 张冬梅, 石洁, 李耀发, 2018. 冀东地区二点委夜蛾对夏玉米危害研究. 玉米科学, 26(2): 138-141]

Zhang YF, Xiu WM, Yang DL, Dong SL, Liu YS, 2011. Tissue specific expression and temporal and spatial expression of atypical odorant receptor gene *OR2* in *Spodoptera exigua* (Hübner). *Chin. Agric. Sci. Bull.*, 27(7): 231-235. [张逸凡, 修伟明, 杨殿林, 董双林, 刘玉升, 2011. 甜菜夜蛾非典型嗅觉受体基因 *OR2* 的组织特异性和时空表达. 中国农学通报, 27(7): 231-235]

Zhang YN, Du LX, Xu JW, Wang B, Zhang XQ, Yan Q, Wang G, 2019. Functional characterization of four sex pheromone receptors in the newly discovered maize pest *Athetis lepigone*. *J. Insect Physiol.*, 113: 59-66.

Zhang YN, Zhu XY, Ma JF, Dong ZP, Xu JW, Kang K, Zhang LW, 2017. Molecular identification and expression patterns of odorant binding protein and chemosensory protein genes in *Athetis lepigone*

(Lepidoptera: Noctuidae). *PeerJ*, 5: e3157.

Zhang ZY, Yang SS, Meng J, Zhao HT, Jiang YS, 2016. Expression and localization analysis of olfactory receptor AcerOrco in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Entomol. Sin.*, 59(2): 185–191. [张中印, 杨珊珊, 孟娇, 赵慧婷, 姜玉锁, 2016. 中华蜜蜂嗅觉受体 AcerOrco 的表达及定位分析. 昆虫学报, 59(2): 185–191]

Zhou YL, Zhu XQ, Gu SH, Cui HH, Guo YY, Zhou JJ, Zhang YJ, 2014. Silencing in *Apolygus lucorum* of the olfactory coreceptor Orco gene by RNA interference induces EAG response declining to two putative semiochemicals. *J. Insect Physiol.*, 60: 31–39.

（责任编辑：马丽萍）